PROF. ALBERTO MARRASSINI
direttore dell'Istituto di Patologia generale e di Batteriologia
della Università di Ferrara

Sulla pretesa reversibilità del fenomeno di sensibilizzazione opsonica secondo la legge delle reazioni monomolecolari.

Risposta alla replica del Prof. Alessandro Amato

FERRARA
INDUSTRIE GRAFICHE ITALIANE
1922

Prof. ALBERTO MARRASSINI
direttore dell'Istituto di Patologia generale e di Batteriologia
della Università di Ferrara

Sulla pretesa reversibilità del fenomeno di sensibilizzazione opsonica secondo la legge delle reazioni monomolecolari.

Risposta alla replica del Prof. Alessandro Amato

FERRARA
INDUSTRIE GRAFICHE ITALIANE
1922

Il Prof. A m a t o nel N. 28 della *Rivista Critica di Clinica Medica* del 1921, replicando per la seconda volta a delle critiche da me mosse alle sue ricerche sulla distribuzione delle opsonine tra plasma batterico e liquido ambiente ed a quelle sulla reversibilità del fenomeno di sensibilizzazione opsonica, vuole, sotto una veste diversa, sostenere i suoi risultati e le sue conclusioni.

Rimando alle mie due note precedenti (1) per i dati di fatto, in base ai quali dimostrai la inammissibilità delle tesi avanzate dal Prof. A m a t o, e mi fermo a prendere in considerazione unicamente quanto egli afferma nella replica suaccennata: con la quale in sostanza il Prof. A m a t o vorrebbe destituire di fondamento le argomentazioni da me addotte in passato, perchè, secondo lui, io non avrei considerato, o ricordato, o capito, che egli, nelle sue ricerche sul processo di reversione delle opsonine dal plasma batterico al liquido ambiente, ha applicato ad una reazione incompleta, che porta ad un equilibrio, la formula $a = \frac{1}{t} \log \frac{A}{A-q}$ propria delle reazioni monomolecolari. E si indugia sopratutto a dimostrare con formule e passaggi di calcolo infinitesimale la legittimità dell'impiego di questa formula in quelle reazioni; onde conseguirebbe che il simbolo A della formula stessa non avrebbe più il significato della massa totale od iniziale M, bensì quello della differenza tra la massa iniziale M e la massa N, che non subisce alcuna trasformazione sino alla fine del processo; ossia il simbolo A avrebbe il

(1) M a r r a s s i n i — Pathologica, 1920, N. 286 e *Lo Sperimentale*, 1921, Vol. 75, Fasc. 4-5, p. 277.

significato della quantità di sostanza che si trasforma completamente durante la reazione, cioè di quella parte delle opsonine che al ristabilirsi dell'equilibrio è ritornata dal plasma batterico nel liquido ambiente.

Per quanto nella mia seconda nota (*Lo Sperimentale* 1921, Vol. 75, p. 281) questa ipotesi fosse già preveduta e confutata nella sua base fondamentale, ritengo utile tuttavia, ora che il Prof. Amato maggiormente vi insiste, di svolgere i fatti in modo da renderli chiari quanto più è possibile.

Il Prof. Amato, come cardine di tutte le sue deduzioni, sostiene: *ammesso che* (nel processo di reversione delle opsonine dal plasma batterico nel liquido ambiente) *sia M la quantità della sostanza portata in esperimento, che sia N la parte che non subisce alcuna trasformazione sino alla fine del processo, indicando ancora con q la porzione trasformata nel tempo t, si può porre*

$$\frac{dq}{dt} = a\,[(M-N) - q]$$

Io considererò l'applicazione di questa formula, impostata da Amato, sia dal punto di vista teorico e generico, sia dal punto di vista particolare; in modo da stabilire anzitutto se tale premessa sia esatta e non arbitraria, tanto da condurre artificiosamente, anche attraverso ragionamenti e calcoli perfetti, alle conclusioni che uno si prefigge; e di vedere poi (il che non ha minor valore) se queste conclusioni si trovino sempre in armonia con tutte le fasi di una medesima ricerca.

Per ciò che riguarda il punto di vista teorico, mi limito a rilevare che nelle reazioni, che conducono ad un equilibrio di primo ordine, pur essendovi, della massa iniziale, una parte, che rimane teoricamente invariata sino alla fine del processo, essa, facendo parte tuttavia della massa attiva, non è senza influenza sulla velocità con cui l'altra porzione si trasforma; mentre d'altra parte su questa velocità influisce altresì quella, con cui la quantita di sostanza man mano trasformatasi ritorna nella fase primitiva in virtù del processo di reversione, che di ogni equilibrio rappresenta la base fondamentale. Ed a questo proposito i manuali di chimica e di chimica-fisica dànno per queste reazioni, che portano anche il nome di *reazioni contrarie*, la equazione che comprende i due processi inversi e che è appunto:

$$\frac{dq}{dt} = a\,(M\text{-}q) - b\,(N+q)$$

in cui *a* e *b* rappresentano rispettivamente i coefficienti di velocità delle due reazioni contrarie, M la massa attiva iniziale ed N la massa attiva che dà la reazione in senso inverso (1).

Come appare evidente dalla formula generica soprascritta si passa a quella parziale

$$\frac{dq}{dt} = a\,(M\text{-}q),$$

presa come punto di partenza da A m a t o, e propria delle reazioni monomolecolari, soltanto quando la porzione b (N+q) sia uguale a zero, ossia quando non esista il processo di reversione, il quale invece nel fenomeno di opsonizzazione rappresenta la base di tutte le ricerche di A m a t o. E ciò senza considerare che se veramente, come ammette A m a t o nel suo primo lavoro *(Lo Sperimentale* 1917, Vol. 71, p. 459), le opsonine nel plasma batterico si scindessero in modo da dar luogo a tre molecole ogni due molecole originarie, le masse attive contenute nei due solventi dovrebbero agire rispettivamente in funzione della terza e della seconda potenza; il che A m a t o trascura nel modo più completo.

Nè risultato più confortante si ottiene quando si consideri nel caso speciale la verifica fatta da A m a t o della formula $a = \frac{1}{t} \log \frac{A}{A\text{-}q}$, derivante dall'altra $\frac{dq}{dt} = a\,[(M\text{-}N) - q)]$, in cui (M-N) è fatto uguale ad A; verifica, il cui valore, secondo A m a t o, dovrebbe essere al di fuori ed al di sopra di ogni concezione teoretica.

Se nello studio del processo di ritorno delle opsonine dal plasma batterico al liquido ambiente A m a t o ha ottenuto cifre, che gli hanno dato una costante di velocità con un valore del simbolo A della formula suddetta corrispondente a $\frac{38{,}5}{100}$ della quantità iniziale di opsonine (Lo *Sperimentale* 1921 p. 271), poichè, secondo lui, come già si è detto, il simbolo A della ricordata formula (essendo uguale alla differenza tra la quantità iniziale M delle opsonine e la quan-

(1) N e r n s t — Theoretische Chemie. Stuttgart, 1898, p. 504 e seg.
J o n e s — Chimica-fisica. Hoepli, Milano, 1913, p. 529.

tità N, che non subisce trasformazione sino alla fine del processo) rappresenterebbe la quantità di opsonine che si trasforma ritornando nel liquido ambiente, vuol dire che gli altri $\frac{61,5}{100}$ rimarranno nel plasma batterico. E così, essendo negli esperimenti 7, 8, 9, 10 la quantità iniziale delle opsonine uguale a 0.70 (Lo *Sperimen.* Vol. 73 p. 269 tab. IV) — poichè in base alle sue precedenti ricerche Amato ritiene che la distribuzione delle opsonine tra plasma batterico e liquido ambiente abbia luogo secondo la formula di Arrhenius $A = k\,B^{2|3}$, in cui il simbolo A indica la quantità di opsonine contenute nel plasma batterico ed il simbolo B quella delle opsonine contenute nel liquido ambiente ——, dovrebbe risultare una costante di equilibrio $k = \frac{\left(\frac{61,5 \times 0,70}{100}\right)}{\sqrt[3]{\left(\frac{38,5 \times 0,70}{100}\right)^2}} = 1,03$: mentre le cifre riportate nella stessa tab. IV di Amato e corripondenti alla prima fase dello esperimento, che ha preceduto l'altro sulla reversione, dànno una costante di equilibrio $k = 1,25 \left(\frac{70}{\sqrt[3]{(42)}}\right)$. Lo stesso dicasi per lo esperimento 2, dove il calcolo darebbe per la prima fase una costante di equilibrio $k = 1,14$, mentre quella calcolata nel modo suddetto per la fase di reversione corrisponderebbe a 0,88.

Talchè risulterebbe che le stesse opsonine di fronte agli stessi batteri, costanti per qualità e quantità (*), mentre nel passaggio dal liquido ambiente al plasma batterico si distribuirebbero con una costante di equilibrio determinata, quando invece dal plasma batterico ritornano nel liquido ambiente, potrebbero dare una costante di equilibrio inferiore di circa 1|5 in un caso e nell'altro caso inferiore di circa 1|4.

(*) NOTA — Se poi si pensa che la quantita di opsonine rimaste nel plasma batterico può anche essere aumentata negli esperimenti di reversione per la inevitabile moltiplicazione dei batteri mantenuti a 37.°C fino ad oltre tre ore, appare subito, dalla frazione sopra riportata, come questa differenza, a condizioni invariate, possa risultare anche spiccatamente maggiore.

Ora, se si pensa che la costante di equilibrio non rappresenta altro che il rapporto fra i coefficienti delle velocità con cui procedono le due reazioni contrarie, che dànno l'equilibrio medesimo, e che queste reazioni contrarie, giova ripeterlo, costituiscono la *conditio sine qua non* perchè possa ammettersi la soggezione del fenomeno alla legge di equilibrio di massa, io non so come possa reggersi l'edificio costruito dal Prof. Amato, per ammettere che la distribuzione delle opsonine tra plasma batterico e liquido ambiente abbia luogo secondo una legge costante (e precisamente secondo la ripetuta formula di Arrhenius), che il fenomeno sia reversibile, e che la reversione segua la legge delle reazioni monomolecolari.

Ma non posso nè debbo terminare senza fare un'ultima considerazione, che basterebbe da sola a rendere superflue tutte le altre. Essa, per la Redazione della *Riv. Crit. di Clin. Med.* (1921, N. 31) — la quale, con un sistema veramente nuovo negli annali della stampa scientifica, si è permessa di rifiutare a me quella ospitalità, che prima ha concesso ad Amato, mentre non si è ritenuta da esprimere commenti tutt'affatto arbitrari — varrà a dimostrare che la quistione non verte su apprezzamenti di applicazione di formule matematiche e su differente interpretazione di fatti, che solo ulteriori ricerche potranno definire; ma che si tratta bensì di dati di fatto positivi e di ricerche incriminabili fin dalla loro origine: e varrà altresì a giustificare il fatto, che io non intenderò comprendere nel numero delle mie nuove ricerche, anche quelle sopra il fenomeno di opsonizzazione, tantochè Amato non abbia da ciò a trarre nuovo argomento a sostegno delle sue tesi.

La considerazione riguarda appunto il procedimento di determinazione delle opsonine, rilevato dal computo del valore fagocitario (V F).

Se nella valutazione quantitativa delle agglutinine e delle emolisine, quando gli esperimenti siano condotti al riparo delle numerose cause di errore, si possono ottenere risultati di una certa attendibilità, inquantochè vi ha l'unità di misura, costituita rispettivamente dalla unità agglutinante e da quella emolitica, l'una e l'altra riferentisi ad una quantità determinata di siero, ricavata dalla diluizione massima, che in un volume fisso provoca su quantità fisse di antigene il fenomeno specifico completo, ciò non credo possa avvenire col procedimento seguito da Amato per la valutazione delle opsonine, poichè il V F non può ritenersi a priori come una espressione

identica a quella della quantità di opsonine che lo determinano. Che anzi, come risulta anche dalle ricerche di Neisser e Guerrini (1), tale parallelismo sarebbe ben lungi dal verificarsi, attesochè diluizioni al $\frac{1}{20}$ del siero normale ne potrebbero abbassare appena alla metà il V F, mentre diluizioni al $\frac{1}{200}$ potrebbero dare un V F ridotto soltanto ad $\frac{1}{10}$ circa.

Ma prescindendo anche da ciò, come pure dal fatto, già da me altrove rilevato (*Pathologica* 1920 N. 286), che negli esperimenti sulla distribuzione delle opsonine e sulla loro reversione è necessario fare uso di batteri vivi, i quali, mantenuti vario tempo a 37°C, tolgono con la loro moltiplicazione ogni valore a qualunque minuta determinazione quantitativa in proposito, e prescindendo anche dalla non facile comprensione del meccanismo, con cui una sostanza attiva come la opsonina (che, se seguisse la legge di distribuzione, dovrebbe diffondersi uniformemente nel plasma di tutti i batteri postivi a contatto) possa provocare la fagocitosi di alcuni elementi e non di altri, vediamo come Amato ha proceduto nelle sue determinazioni.

Egli ha preso a base dei suoi computi il V F, ossia la media dei batteri fogocitati da ciascun leucocita, e da quello ha dedotto il contenuto di opsonine di un liquido, esprimendolo col V F stesso. Ora, poichè le opsonine dovrebbero agire, e ciò deriva anche dalle ricerche di Amato, in quanto passano nel plasma batterico, vuol dire che per Amato tra V F, quantità di opsonine contenute nel plasma batterico e quantità di opsonine contenute nel liquido di esperimento corre un rapporto fisso: il quale, per la uguaglianza di espressione usata da Amato tra V F ed opsonine del liquido di esperimento, è ovvio non possa essere che un semplice rapporto aritmetico, in modo che a multipli del V F corrispondano multipli uguali delle altre due quantità.

Chè se ciò Amato non ammettesse, rimarrebbe ignota in modo completo la relazione che passa tra il V F e la quantità di opso-

(1) Neisser e Guerrini — Citati da Lustig nel Trattato delle malattie infettive. Vallardi, 1913, Vol. 1, p. 300.

nine contenute nel plasma batterico, dalle quali la fagocitosi è stimolata, e sarebbe anche più incerto il rapporto esistente tra V F e quantità di opsonine contenute nel liquido di esperimento, talchè la equiparazione (seguita da A m a t o) dei due termini, già di per sè arbitraria, non sarebbe neanche ipoteticamente sostenibile, e con essa cadrebbero spontaneamente tutti i risultati, che attraverso di quella A m a t o ha ottenuto.

Ove poi si consenta un punto di partenza ipotetico come quello cui ora ho accennato, io non so come allora si possa accettare la conclusione, cui giunge A m a t o coi risultati dei suoi esperimenti, pei quali si dovrebbe ammettere che le opsonine si distribuiscono tra plasma batterico e liquido ambiente secondo la formula di **A r r h e n i u s** più volte ripetuta. O questa distribuzione esiste, ed il V F è in funzione della quantita di opsonine passate nel plasma batterico, ed esso allora dovrebbe riferirsi, se mai, alla quantità di opsonine contenute nel plasma batterico stesso, e da questa poi, con un rapporto che alla detta distribuzione corrisponda, dedurre la quantità di opsonine esistenti nel liquido ambiente e quindi la quantità totale di quelle proprie del liquido di esperimento; ma allora è evidente, che mentre non sarebbe affatto lecito esprimere questa quantità totale col semplice V F, come ha fatto A m a t o, si cadrebbe d'altra parte in una manifesta petizione di principio; o il V F è direttamente proporzionale (in proporzione semplice, aritmetica, come quella sopra accennata), in modo da poterlo fare anche uguale, alla quantità tolale delle opsonine del liquido di esperimento, ed allora non so come si possa arrivare alla conclusione finale, cui A m a t o perviene: o infine tra V F e quantità di opsonine, che lo determinano, vi è un rapporto ignoto, - il che fino ad ora è in realtà da ritenersi, - ed allora, come ho già detto in precedenza, manca la base, che deve sostenere tutte le ricerche, che A m a t o ha eseguite, e quindi anche le conclusioni alle quali è pervenuto.

Così, anche senza voler salire le vette del calcolo infinitesimale, conservandomi nel campo dell'aritmetica poco più che elementare, ma sopratutto in quello della logica e del buon senso, parmi di aver dimostrato anche sotto questo aspetto la insostenibilità delle tesi di A m a t o.

E voglio sperare che il Prof. A m a t o sia convinto che le mie critiche non furono mosse, come egli vorrebbe far credere, nè dal-

desìderio di voler fare della critica infondata per diletto, nè da quello di promuovere polemiche personali: ma sopratutto son sicuro che egli rimarrà persuaso, che se nella mia prima nota dissi di voler circoscrivere le mie obiezioni a pochi, ma pur sufficienti, dati di fatto, ciò ebbe luogo non già per deficienza di argomenti, bensì unicamente per spirito di collegiale benevolenza e longanimità.

Ferrara, 20 Decembre 1921

NOTA — Mi è doveroso e gradito esprimere i sensi della mia gratitudine alla Direzione ed alla Redazione del « *Giornale di Psichiatria clinica e Tecnica manicomiale* » per la cortese ospitalità, che mi hanno concessa.

E per non occupare spazio ulteriore, e per non essere costretto a confutare sino all'infinito quelle, che il Prof. Amato chiama felici applicazioni e che con ogni replica aggiunge alle precedenti, rinnovo al Prof. Amato lo invito già fattogli pervenire fino dallo Ottobre u. s.

L'invito consiste precisamente nel discutere con me le sue asserzioni di fronte a persone competenti e di autorità superiore, scelte a suo piacimento, e di pubblicare poi in poche parole il risultato della discussione.

Ma a questo proposito, son sicuro che il Prof. Amato si manterrà, come ha fatto a tutt'oggi, in un prudente silenzio.

Stampe

Sig.
Prof. Pio Foà
Istituto d'Anatomia patologica
della R. Università
Torino